

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/003053

International filing date: 24 February 2005 (24.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-056707
Filing date: 01 March 2004 (01.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/JP2005/003053

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

28.02.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2004年 3月 1日

出 願 番 号
Application Number: 特願2004-056707

パリ条約による外国への出願
に用いる優先権の主張の基礎
となる出願の国コードと出願
番号
The country code and number
of your priority application,
to be used for filing abroad
under the Paris Convention, is

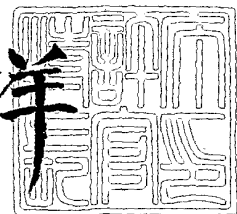
J P 2004-056707

出 願 人
Applicant(s): 独立行政法人科学技術振興機構

2005年 4月 7日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



出証番号 出証特2005-30307

【書類名】 特許願
【整理番号】 AB04011J
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区あざみ野 1 - 2 6 - 4 6
 【氏名】 関根 光雄
【発明者】
 【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区しらとり台 4 8 - 5 第 2 パークサイド内
 田 1 0 2
 【氏名】 清尾 康志
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都町田市小川 1 - 1 0 - 5 - 2 0 2
 【氏名】 大窪 章寛
【特許出願人】
 【識別番号】 503360115
 【氏名又は名称】 独立行政法人 科学技術振興機構
【代理人】
 【識別番号】 100100181
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 阿部 正博
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 053419
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0316565

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

ホスホロアミダイト法においてアルコール型化合物を活性化剤として用いることを特徴とする、核酸オリゴマーの合成方法。

【請求項 2】

ホスホロアミダイト法において、アルコール型化合物及び酸触媒の混合物を活性化剤として用いることを特徴とする、核酸オリゴマーの合成方法。

【請求項 3】

アルコール型化合物がヒドロキシベンゾトリアゾール-1-オール (HOBt)、HOBt 誘導体、及びフェノール類縁体からなる群から選択される、請求項 1 又は 2 記載の合成方法。

【請求項 4】

HOBt 誘導体が 4 及び／又は 6 位に置換基を有する、請求項 1 又は 2 記載の合成方法。

【請求項 5】

HOBt 誘導体が、6-トリフロメチルベンゾトリアゾール-1-オール、6-ニトロベンゾトリアゾール-1-オール、又は 4-ニトロ-6-トリフロメチルベンゾトリアゾール-1-オールである、請求項 4 記載の合成方法。

【請求項 6】

フェノール類縁体が 2, 4-ジニトロフェノール、3, 4-ジシアノフェノール及び 2-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールから成る群から選択される、請求項 3 記載の合成方法。

【請求項 7】

酸触媒が、イミダゾール、テトラゾール、及びそれらの誘導体から成る群から選択される、請求項 2～6 のいずれか一項に記載の合成方法。

【請求項 8】

酸触媒が、ベンズイミダゾールトリフラート (BIT)、4-エチルチオテトラゾール、イミダゾリウムトリフラート、又は 4, 5-ジシアノイミダゾールである、請求項 7 記載の合成方法。

【請求項 9】

アルコール型化合物及び酸触媒を等量含む混合物を活性化剤として使用する、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の合成方法。

【請求項 10】

固相担体を用いる、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の合成方法。

【請求項 11】

請求項 1～10 のいずれか一項に記載の合成方法によって調製された、少なくとも 10 量体の核酸分子オリゴマー。

【請求項 12】

20 量体の DNA オリゴマーである、請求項 11 記載の核酸分子オリゴマー。

【請求項 13】

DNA チップ用の請求項 11 又は 12 に記載の核酸分子オリゴマー。

【書類名】明細書

【発明の名称】塩基部無保護法による新規核酸合成法

【技術分野】

【0001】

本発明は、塩基部無保護法による新規核酸合成方法、特に、ホスホロアミダイト法においてアルコール型化合物を活性化剤として用いることを特徴とする、核酸オリゴマーの合成方法に関する。

関する。

【背景技術】

【0002】

従来、塩基部位を保護しないでDNAを化学合成する方法としては、ホスホニウム型縮合剤BOMPを用いて水酸基選択的な縮合反応を行うH-ホスホネート法が知られている（非特許文献1）。この反応では、縮合反応中に生成する活性なホスファイト中間体が、塩基部のアミノ基よりも水酸基に対して優先的に反応することを利用している。

【0003】

【非特許文献1】Wada, T.; Sato, Y.; Honda, F.; Kawahara, S.; Sekine, M., Journal of the American Chemical Society 1997, 119, 12710-12821

【非特許文献2】Gryaznov, S. M.; Letsinger, R. L., Journal of the American Chemical Society 1991, 113, 5876-5877

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、上記のH-ホスホネート法では、鎖長が長くなるにつれて、DNA合成において分子内環化反応のような塩基部位での副反応が指数関数的に増えるため、12量体を過ぎると主生成物として目的のDNAオリゴマーを得ることは極めて困難であった。また、シトシン塩基を含むDNAは副反応が多く、これを防ぐよい方法は知られていなかった。

【課題を解決するための手段】

【0005】

そこで、本発明者は、長鎖オリゴマーの合成が容易なホスホロアミダイト法（非特許文献2）において、活性なホスファイト中間体を形成することによって、水酸基選択的なリン酸化を利用したDNA合成法が可能になるのではないかと考え、鋭意研究を重ねた結果、本発明を完成した。

【0006】

即ち、本発明は、ホスホロアミダイト法においてアルコール型活性化剤、又は、アルコール型活性化剤及び酸触媒の組み合わせを用いることを特徴とする、核酸オリゴマーの合成方法に係る。

【発明の効果】

【0007】

これまでの塩基部無保護法においては12量体の合成が限界であったが、本発明により、塩基部位を全く保護しないで、少なくとも10量体の核酸分子オリゴマー、例えば、20量体程度のDNAオリゴマーを固相法において極めて高純度で合成することが可能となる。かかるDNAオリゴマーはDNAチップ用に有利に使用することが出来る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

アルコール型活性化剤としては当業者に公知の任意の化合物を使用することができるが、高い縮合効率（例えば、95%以上）を得る為には、特に、ヒドロキシベンゾトリアゾール-1-オール（HOBt）、HOBt誘導体、及びフェノール類縁体からなる群から選択される化合物が好ましい。HOBt誘導体としては、ニトロ、プロモ、ヨード、トリフロメチル基等の置換基が1~4個導入されたもの、例えば、6-トリフロメチルベンゾ

トリアゾール-1-オール、6-ニトロベンゾトリアゾール-1-オール、又は4-ニトロ-6-トリフロメチルベンゾトリアゾール-1-オールのようなHOBt誘導体が好ましく、4及び/又は6位にトリフロメチル及びニトロ基のような各種置換基を有するHOBt誘導体が特に好ましい。

【0009】

フェノール類縁体としても当業者に公知の任意の化合物を使用することが出来るが、同様に高い縮合効率を得る為には、2, 4-ジニトロフェノール、3, 4-ジシアノフェノール及び2-ニトロ-4-トリフルオロメチルフェノールが好適である。

【0010】

一方、酸触媒としては当業者に公知の任意の化合物を使用することが出来るが、特に、イミダゾール、テトラゾール、及びそれらの誘導体が好ましい。これらの好適な具体例として、ベンズイミダゾールトリフラート(BIT)、4-エチルチオテトラゾール、イミダゾリウムトリフラート、及び4, 5-ジシアノイミダゾール等を挙げることが出来る。

【0011】

アルコール型活性化剤及び酸触媒の組み合わせにおいて、その量比は、各化合物の種類、反応溶媒等の諸条件に応じて当業者が適宜選択することができる。通常、1:10~10:1の当量比である。

【0012】

本発明の合成反応は固相又は液相等の任意の系で実施することが出来るが、工業的にオリゴマーを合成するような場合には固相担体を用いる合成方法が好ましい。固相担体は当業者に公知の任意の物質、例えば、CPG又はHCPを使用することが出来る。

【0013】

本発明において、核酸はDNA又はRNAであり、それを構成する塩基は天然構造以外に、糖部位にシクロヌクレオシド骨格を有するもの、その2'及び/又は4'に各種置換基を有するもの等の各種修飾体及び変異体も含まれる。更に、リン酸基に関しても、例えば、ホスホロチオエートまたはメチルホスホネートの骨格を有するものも含まれる。

。

【0014】

ホスホロアミダイト法において、本明細書中に特記されていない各種反応条件は、本発明の実施に際して、当業者が適宜選択することが出来るものである。

【実施例】

【0015】

以下、実施例に則して本発明を更に詳しく説明する。尚、本発明の技術的範囲はこれらの記載によって何等制限されるものではない。

【0016】

実施例1: 2量体及び3量体の固相合成

末端にチミジンを導入したHCP固相担体を使用して、本発明方法における水酸基選択性を検討した。HCP固相担体上の末端水酸基に対して各塩基(A, C, G, T)を含むアミダイトユニット20当量と各種活性化剤40当量を用いて、1分間リン酸化反応を行った後、0.1Mヨウ素溶液(ピリジン:水=9:1)で酸化した(室温で2分間)。次に、3%トリクロロ酢酸-CH₂Cl₂溶液によりDMTr基を脱保護し(室温、1分間)、続いてアンモニアによるリン酸保護基(2-シアノエチル基)の切り出し・脱保護(室温、12時間)を行った。

活性化剤として従来のIMTを活性化剤として使用した場合には、d[ApT]及びd[CpT]が夫々、77%及び83%の水酸基選択性で得られた。これに対して、活性化剤として、HOBt活性化剤としてを使用した場合には、d[ApT]及びd[CpT]が夫々、99.7%及び99.9%の水酸基選択性で得られた。ここで、水酸基選択性は、HPLCチャートに現れる目的化合物のピークとN-リン酸体のピークの面積比から算出した値である。

【0017】

実施例 2：3 量体の固相合成

更に、塩基部無保護 DNA 合成における HOBt の有用性を確認する為に、各種の 3 量体を合成した。まず、実施例 1 の方法において HOBt を活性化剤として使用して、各種 2 量体を合成し、その後、さらに縮合反応を行い、各種 3 量体を合成した。d [TpApT] 及び d [TpCpT] の合成において、IMT を使用したときにはかなりの量の副反応生成物が観察された。

以上の結果を表 1 に示す。尚、表 1 には、CH₃CN-NMP 混合溶媒系でプロトンブロック法の活性化剤である NBT を使用した場合の結果も併せて記載されている。

【0018】

【表1】

compd	polymer	final product	% ratio of the desired product					
			IMT	NBT	HOBT	HO ^u Bt	HO ^u Bt	DNP
2-11a	T-HCP	ApT	77.0%	99.2%	99.7%	99.3%	98.8%	96.1%
2-11c	T-HCP	CpT	82.9%	99.0%	99.9%	98.9%	99.8%	92.4%
2-11g	T-HCP	GpT	>99.9%	>99.9%	>99.9%	>99.9%	>99.9%	>99.9%
2-4	d[ApT]-HCP	TpApT	90.5%	>99.9%	>99.9%	99.1%	97.5%	96.7%
2-4	d[CpT]-HCP	TpCpT	9.7%	99.8%	>99.9%	98.7%	97.2%	64.7%
2-4	d[GpT]-HCP	TpGpT	>99.9%	>99.9%	>99.9%	>99.9%	>99.9%	>99.9%

【0019】

実施例3: DNA合成機を用いる長鎖オリゴマーの合成

d[CCCCCTTTCTCTCTCTCT]と[TTAAAAATTATTAATTATT]それぞれの合成はApplied Biosystems

Inc. (ABI) のDNA/RNA

Synthesizer 392を使用した。DNAオリゴマーの自動合成機による合成は、末端にチミジンを導入したHCP固相担体 (1 μ mol, 28 μ mol/g, サクシニルリンカー)、また活性化剤として0.2M HO^tBt (6-トリフルオロメチルベンゾトリアゾール-1-オール)+0.2M BIT (ベンズイミダゾールトリフラート)の CH₃CN - N-メチル2-ピロリドン (15:1, v/v) 溶媒を用いて行った。合成各鎖伸長サイクルは、以下の表2に示すとおりである。

【0020】

【表2】

step	operation	reagent(s)	time, (min)
1	washing	CH ₃ CN	0.2
2	detritylation	3% Cl ₃ CCOOH / CH ₂ Cl ₂	1.5
3	washing	CH ₃ CN	0.4
4	coupling	0.1M amidite + 0.2M HO ^t Bt in CH ₃ CN-NMP (15:1, v/v)	1.0
5	washing	CH ₃ CN	0.2
6	coupling	0.1M amidite + 0.2M HO ^t Bt in CH ₃ CN-NMP (15:1, v/v)	1.0
7	washing	CH ₃ CN	0.2
8	oxidation	0.1M I ₂ in Py-H ₂ O-THF (20:2:78, v/v/v)	0.5
9	washing	CH ₃ CN	0.4

【0021】

続いて、DMTr基を1分間のCH₂Cl₂ (2 mL)中の3%トリクロロ酢酸で除去し、CH₂Cl₂ (1 mL x 3), CH₃CN (1 mL x 3)で固相担体を洗浄した。最後に、固相担体を40分間の濃アンモニア水

(500 μ L)処理で切り出し、脱保護を行って目的物を得た。

d[CCCCCTTTCTCTCTCTCT],

Mass (M+H) calcd 5868.23, found 5869.92; Enzyme Assay dC:T = 1.00:0.99.

[TTAAAAATTATTAATTATT],

Mass (M+Na) calcd 6130.31, found 6132.69; Enzyme Assay dA:T = 1.00:0.94.

【産業上の利用可能性】

【0022】

20量体程度のDNAフラグメントは遺伝子診断で汎用されているアフィメトリック社製のDNAチップで必要とされている鎖長であり、この長さのDNAが塩基部位無保護で合成が可能になったことは、きわめてコストパフォーマンスのよいDNAチップのハイスループット調製への糸口を切り開くもので、バイオ分野に与える影響は大きい。本発明は、塩基部無保護法で初めての実用的レベルに達した合成法であり、本発明方法で合成された核酸オリゴマーのSNP解析などの遺伝子診断への応用が期待される。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 これまでの塩基部無保護法においては12量体の合成が限界であったが、本発明により、塩基部位を全く保護しないで、少なくとも10量体の核酸分子オリゴマー、例えば、20量体程度のDNAオリゴマーを固相法において極めて高純度で合成することができる、新たな核酸オリゴマーの合成方法を提供すること。

【解決手段】 ホスホロアミダイト法においてアルコール型活性化剤、又は、アルコール型活性化剤及び酸触媒の組み合わせを用いることを特徴とする、核酸オリゴマーの合成方法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-056707
受付番号	50400334560
書類名	特許願
担当官	岩谷 貴志郎 7746
作成日	平成17年 2月 1日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成16年 3月 1日

特願 2 0 0 4 - 0 5 6 7 0 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 3 6 0 1 1 5]

1. 変更年月日 2 0 0 3 年 1 0 月 1 日
[変更理由] 新規登録
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構
2. 変更年月日 2 0 0 4 年 4 月 1 日
[変更理由] 名称変更
住 所 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
氏 名 独立行政法人 科学技術振興機構